



Zakład Farmakognozji
z Ogrodem Roślin Leczniczych
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Chodźki 1, 20-093 Lublin
Tel. (+48 81) 448 70 80
Faks: (+48 81) 448 70 80



Dr hab. n. farm. Wirginia Kukuła-Koch, prof. UM
Zakład Farmakognozji
z Ogrodem Roślin Leczniczych
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Lublin, 2022-05-26

**Ocena pracy doktorskiej
wykonanej przez Pana magistra Pawła Błażeja Rudnickiego-Velasquez
pt. „Opracowanie metod oznaczania wybranych związków biologicznie aktywnych
z udziałem technik chromatograficznych i spektroskopowych
wspartych analizą statystyczną”**

**w Pracowni Badań Luminescencyjnych, Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego
pod opieką:**

Promotora - Pana dr hab. Karola Jana Krzywińskiego, profesora Uniwersytetu Gdańskiego
oraz Promotora pomocniczego – Pani dr hab. n. med. Magdaleny Jankowskiej

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest monografią, do której dołączono trzy artykuły naukowe (trzy prace oryginalne), opublikowane w latach 2017-2021 w renomowanych czasopismach z listy Journal Citation Reports ("Journal of Chromatography B", „Blood Purification” oraz „Luminescence”) o sumarycznym współczynniku oddziaływania Impact Factor (IF) wynoszącym 6,979.

Oceniana rozprawa doktorska obejmuje 111 stron maszynopisu oraz dodatkowo załączniki w postaci pełnych tekstów opublikowanych prac naukowych obejmujących tematykę doktoratu. Rozprawę przygotowano starannie i schludnie, zachowując typową dla prac doktorskich strukturę uwzględniającą: część literaturową, cele pracy, materiały i metody,

wyniki i dyskusję wyników, wnioski, wykaz literatury naukowej oraz aneks zawierający tabele z danymi. W formie dodatkowych rozdziałów Pan magister przedstawił opis Swojego dorobku naukowego oraz pełne teksty prac podejmujących omawianą na kartach rozprawy tematykę badawczą. Na uwagę zasługuje część teoretyczna pracy, która jest wielowątkowa i pozwala zauważyć, że Doktorant posiada interdyscyplinarne zainteresowania.

Część teoretyczna pracy obejmująca 34 strony (ok. 1/3 rozprawy) stanowi przegląd literatury naukowej obejmującej charakterystykę, właściwości chemiczne, fizykochemiczne i znaczenie biologiczne badanych witamin: witaminy B1, B6, charakterystykę antyvitaminy B1 (oksytyaminy), a także zagadnienia związane z awitaminozą, hiperwitaminozą i hipowitaminozą. Część literaturowa obejmuje także bardzo ciekawe zestawienie różnych metod analitycznych stosowanych w detekcji witamin B1 i B6, które mogłoby być wykorzystane w przygotowaniu kolejnej pracy – publikacji przeglądowej. Bardzo cenne są zebrane tu informacje dotyczące typu stosowanych detektorów, rodzaju kolumn chromatograficznych i stosowanych układów rozwijających w analizie dwóch badanych witamin.

Na kolejnych kartach rozprawy Doktorant charakteryzuje oksytyaminę – antyvitaminę B1 oraz sposoby detekcji tego związku przy zastosowaniu nowoczesnych technik analitycznych, a także dwa typy leczenia nerkozastępczego (hemodializę i dializę otrzewnową) i zastosowania analityczne procesu chemiluminescencji.

W moim odczuciu korzystna byłaby zmiana kolejności opisywanych zagadnień i przedstawienie problemów wynikających z dializoterapii na początku części teoretycznej, problemów analitycznych - w dalszej części pracy. Obecna struktura prowadzi czytelnika od metod analitycznych, przez zaburzenia pracy nerek, ponownie do metod analitycznych.

Piśmiennictwo w ocenianej pracy jest obszerne, obejmuje 115 pozycji literaturowych. Lista uwzględnia zarówno opracowania podręcznikowe, jak i prace oryginalne, opublikowane w czasopismach o międzynarodowym zasięgu, głównie anglojęzyczne. W pracy (poza aneksem) zamieszczono także 18 rycin oraz 21 tabel prezentujących zarówno dane literaturowe, jak i wyniki badań.

Część doświadczalna pracy (obejmująca kolejne 49 stron) podzielona jest na podrozdziały:

-‘Materiały i metody’, który poprawnie i bardzo dokładnie przedstawia zarówno aparaturę wykorzystaną w badaniach, materiał badawczy, jak i zastosowane procedury badawcze i testy statystyczne,

- 'Wyniki i dyskusję', pokazujące najważniejsze osiągnięcia wypracowane w niniejszej pracy w świetle dotychczas opublikowanych danych
- oraz 'Wnioski' podsumowujące wszystkie opisane rezultaty.

Pan mgr Paweł Błażej Rudnicki-Velasquez jasno przedstawia cele Swojej pracy - chęć wykorzystania nowoczesnych metod analitycznych do określenia poziomów witamin B1 i B6 we krwi i w dializatach pacjentów z niewydolnością filtracji kłębuszkowej i dyskutuje podejmowane zadania z obecnym stanem wiedzy.

W dostępnej literaturze wciąż brakuje informacji na temat utraty witamin i innych związków rozpuszczalnych w wodzie podczas dializ, a określenie poziomu tych niezbędnych substancji jest także trudnym wyzwaniem analitycznym ze względu na konieczność pracy z próbkami o bogatej matrycy i niewielkich ilościach oznaczanych związków w materiale. Do przeprowadzenia oznaczeń zawartości witamin i antywitaminy Doktorant wybrał wysokosprawną chromatografię cieczową sprzężoną z detektorem fluorescencyjnym.

Analizę ilościową podjęto w celu wypracowania pewnych, szybkich, powtarzalnych i czułych warunków oznaczania witamin w wymienionym wyżej materiale biologicznym, które mogłyby w dokładniejszy sposób wyjaśnić procesy zachodzące podczas leczenia narkozastępczego.

Metodyka i wyniki badań stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej zostały już ocenione przez recenzentów czasopisma, w którym ukazały się prace i merytorycznie nie budzą żadnych zastrzeżeń. Należy zauważyć, iż zaplanowane przez Doktoranta oraz Promotorów pracy badania są kompleksowe, uwzględniające szeroki wachlarz odpowiednio dobranych metod i z wykorzystaniem nowoczesnej aparatury. Świadczy to o dobrym przygotowaniu Doktoranta do pracy laboratoryjnej przez Promotora i Promotora pomocniczego.

Część analityczna pracy jest mądrze zaplanowana i obejmuje szereg zagadnień związanych z opracowaniem nowych metod detekcji badanych związków. Zdając sobie sprawę z trudu włożonego w wypracowanie opisanych wyników, chciałam podkreślić dużą wartość wyników optymalizacji procesu oznaczania zawartości witamin B1 i B6 w materiale biologicznym wykonaną przez Doktoranta i Współautorów, a w szczególności badania profilu kinetycznego przekształcania ThDP we fluoryzującą pochodną, które mogły przełożyć się na zwiększenie czułości oznaczeń, studium nad wprowadzeniem do próbki odczynnika redukującego – ditiotreitolu w celu poprawienia stabilności próbek, opracowanie kompozycji buforów jako dodatków do fazy rozwijającej w celu poprawienia rozdzielczości pików,

doboru długości fali do detekcji związków, opracowanie kompozycji układów rozdzielających (np. do detekcji oksytiaminy, tiaminy i jej estrów) oraz opracowanie metodyki oznaczania aktywności przeciwutleniającej z wykorzystaniem soli akrydyniowych i metod chemiluminogennych. Na kartach pracy Doktorant przedstawia także szereg parametrów walidacyjnych (s.54) dla zaplanowanej metodyki, co potwierdza poprawne i dogłębne walidowanie zaproponowanych metod oznaczania. Otrzymywane czasy retencji badanych związków są bardzo krótkie, co umożliwia prowadzenie wielu analiz w krótkim czasie i przez to niewielkie zużycie rozpuszczalników.

Ponadto Pan magister opisuje wyniki identyfikacji badanych witamin przy pomocy spektrometru mas – analizuje poprawnie typy fragmentacji związków, posiada wiedzę dotyczącą określania parametrów pracy spektrometru i opracowuje wartości energii zderzeń i przejść MRM, co potwierdza Jego kompetencje w pracy z nowoczesnymi narzędziami analitycznymi.

Na uwagę zasługuje fakt, iż wykonane badania (po uzyskaniu zgody Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym) przeprowadzono na bardzo dużej i dobrze dobranej grupie pacjentów, wykorzystując materiał biologiczny pochodzący od 50 pacjentów poddawanych hemodializie oraz 41 pacjentów dializowanych dootrzewnowo, z uwzględnieniem grupy kontrolnej.

Na podkreślenie zasługuje aplikacyjność prowadzonych badań. Przeprowadzona szczegółowa optymalizacja oznaczeń opisana na kartach dysertacji stanowi alternatywę dla wykorzystywanych dotychczas testów. Wyniki analizy statystycznej potwierdzają równocześnie wyniki otrzymanych przy użyciu dotychczas stosowanej metodyki oraz testów opisanych w pracy doktorskiej, przy jednoczesnej niższej kosztocłonności nowej metodyki.

Mimo braku jednoznacznych wyników analizy statystycznej, bardzo ciekawe są wyniki wstępne, które zwracają uwagę na fakt, iż typ stosowanych membran i czas trwania dializy może być powiązany ze stopniem ubytku aktywnej formy tiaminy podczas pojedynczej sesji hemodializy. Mam nadzieję, że te wyniki stanowią tylko początek w dalszych badaniach dotyczących podjętego tematu badawczego.

Mając na uwadze stale utrzymującą się bardzo wysoką liczbę pacjentów poddawanych hemodializie i dializie otrzewnowej nurt badań, w które wpisuje się dysertacja Pana mgr Pawła Błażeja Rudnickiego-Velasquez jest aktualny. W raporcie wykonanym na podstawie

Polskiego Rejestru Nefrologicznego (PRN) czytamy, że w 2020 roku w Polsce dializowano łącznie 19647 pacjentów, z czego 18847 metodą hemodializy, a 800 metodą dializy otrzewnowej. Mimo, iż liczba ta delikatnie maleje razem ze wzrostem liczby przeszczepianych organów, dysfunkcje pracy nerek stanowią wciąż bardzo istotny problem terapeutyczny.

W tym kontekście przeprowadzone badania są bardzo ważne. Podejmują one aktualną tematykę. Praca pt. „*On the use of acridinium indicators for the chemiluminescent determination of the total antioxidant capacity of dietary supplements*” z 2019 posiada już 6 cytowań, a praca „*Thiamine Diphosphate Status and Dialysis-Related Losses in End-Stage Kidney Disease Patients Treated with Hemodialysis*” z 2017 roku – osiem cytowań.

W tym miejscu chciałam wspomnieć, że Pan magister Paweł Błażej Rudnicki-Velasquez posiada bardzo cenny dorobek ponad prace dołączone do dysertacji doktorskiej, a mianowicie trzy kolejne publikacje w czasopismach z IF o sumarycznej wartości 8,965 punktów, kolejne 13 prac/rozdziałów spoza listy MEiN, 13 komunikatów konferencyjnych i aż 15 plakatów konferencyjnych, co świadczy o bardzo dużej naukowej aktywności Doktoranta. Pan magister posiada w Swoim *Curriculum vitae* dwa staże i seminarium naukowe, a także wykonawstwo prac zleconych w dwóch projektach naukowych finansowanych ze środków Narodowego Centrum Nauki.

Wybór specjalistycznych czasopism świadczy o innowacyjności i istotnej wartości poznawczej prezentowanych wyników badań, dobrze dobranej tematyce oraz uznanym warsztacie badawczym.

Mam nadzieję, że w przyszłych pracach Pan magister będzie mógł pełnić rolę osoby piszącej publikacje oraz korespondującej z redakcją czasopism naukowych.

Z obowiązku recenzenta pragnę wskazać kilka niedociągnięć, które napotkałam podczas recenzowania pracy doktorskiej. Pragnę jednak podkreślić, iż nie mają one wpływu na całkowitą bardzo wysoką ocenę merytoryczną rozprawy:

1. Na kartach pracy zauważyć można drobne błędy edytorskie i błędy stylistyczne, co jest nieuniknione podczas pracy z tak obszernym tekstem.

2. Rozdział 1.4. dotyczący hipo- i hiperwitaminozy mógłby być bardziej rozwinięty, aby bardziej podkreślić rolę wybranych witamin w organizmie i konieczność badania ich poziomu.

3. W przyszłych polskojęzycznych pracach naukowych proszę stosować termin 'rozdzielanie chromatograficzne' zamiast 'rozdział chromatograficzny'

4. Na kartach pracy (s.52) czytamy, iż dodatek ditiotreitolu zwiększał stabilność próbek, które zachowywały niezmiennione parametry emisyjne do 24 godzin przy ich przechowywaniu w ciemnym miejscu w temperaturze 4 °C. Wobec powyższego, chciałam serdecznie prosić o komentarz dotyczący sposobu nastrzyku próbek. Czy podobne warunki udawało się utrzymać po włożeniu próbek do autosamplera? Jak w tym świetle wyglądała analiza chromatograficzna. Serdecznie proszę o komentarz.

5. Czy Doktorant planuje prowadzić dalsze badania zawartości kolejnych witamin u pacjentów poddawanych dializie? Do jakich jeszcze oznaczeń mogłyby być wykorzystane stosowane techniki?

6. Jak sprawdzała się technika UHPLC w analizie materiału biologicznego. Czy filtrowanie i wirowanie próbek były wystarczająco skuteczne aby prowadzić analizę chromatograficzną na kolumnach o tak niewielkim ziarnie przy stałym ciśnieniu?

Podsumowując, rozprawę doktorską Pana mgr Pawła Błażeja Rudnickiego-Velasquez oceniam od strony merytorycznej bardzo wysoko. Zarówno treść rozprawy doktorskiej oraz jakość załączonych publikacji naukowych (które były poddane już wcześniejszej ocenie edytorów i recenzentów) świadczy o bardzo dobrym warsztacie przekazanym Doktorantowi przez Promotorów, o przygotowaniu teoretycznym i manualnym Doktoranta, umiejętności organizowania pracy badawczej oraz planowania i rozwiązywania zagadnień naukowych. **Podkreślając, że badania prezentują wysoki poziom naukowy, dostarczają nowych istotnych danych wpływających na rozwój dyscypliny, mają charakter nowatorski i wykazują potencjał do praktycznego wykorzystania, wnioskuje o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.**

Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego prośbę o dalsze procedowanie zmierzające do nadania mgr Pawłowi Błażejowi Rudnickiemu-Velasquez stopnia naukowego **doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.**

Wirginia Kukuła-Koch

dr hab. n. farm. Wirginia Kukuła-Koch,
profesor Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Dr hab. n. farm.
Wirginia Kukuła-Koch
Profesor Uczelni